

# Abschlussbericht

## zum Vorhaben FKZ 2589

### „Donor- und Akzeptorsubstrat-Modifikationen zur chemoenzymatischen Synthese mit rekombinanter Transsialidase (*Trypanosoma cruzi*)“

#### Abstrakt

Das Pathogen *Trypanosoma cruzi* verursacht die Chagas-Krankheit. Dieser Parasit exprimiert beim Eintritt in die Blutbahn des Gastes das Enzym Transsialidase. Dies ist eine Hydrolase, die extrem selektive Übertragungen von N-Acetylneuraminsäure auf die Zellepitope des Pathogens induziert und somit eine Tarnung des Pathogens gegen natürliche Killerzellen des Gastes bewirkt. In unseren Syntheseuntersuchungen sind Modifikationen an der C6-Glycerolseitenkette und der N-Acyelfunktion von Neuraminsäure-Donoren sowie in zahlreichen Disaccharid-Akzeptoren vorgenommen worden. Damit konnten biologisch relevante Neuraminsäure-terminierte Oligosaccharide zugänglich gemacht werden.

Bei der in Süd- und Mittelamerika auftretenden Chagas Krankheit bewirkt die Transsialidase aus *Trypanosoma cruzi* den Transfer von N-Acetylneuraminsäure aus den Zellen des menschlichen Gastes auf die Zellepitope des Pathogens. Durch diese ungewöhnliche Übertragung gelingt es *Trypanosoma cruzi*, die eigenen Zelloberflächen vor der Erkennung durch das menschliche Immunsystem zu schützen. Die Transsialidase zählt zur Superfamilie der Sialidasen, zeigt aber in Gegenwart geeigneter Akzeptormoleküle nur Transglycosylierungen von natürlichen sowie nicht-natürlichen N-Acetylneuraminsäure-Donorsubstraten auf terminal  $\beta$ -galactosylierte Akzeptoren, womit eine Vielzahl komplexer und biologisch aktiver Sialyloligosaccharide gebildet wird.<sup>1</sup>

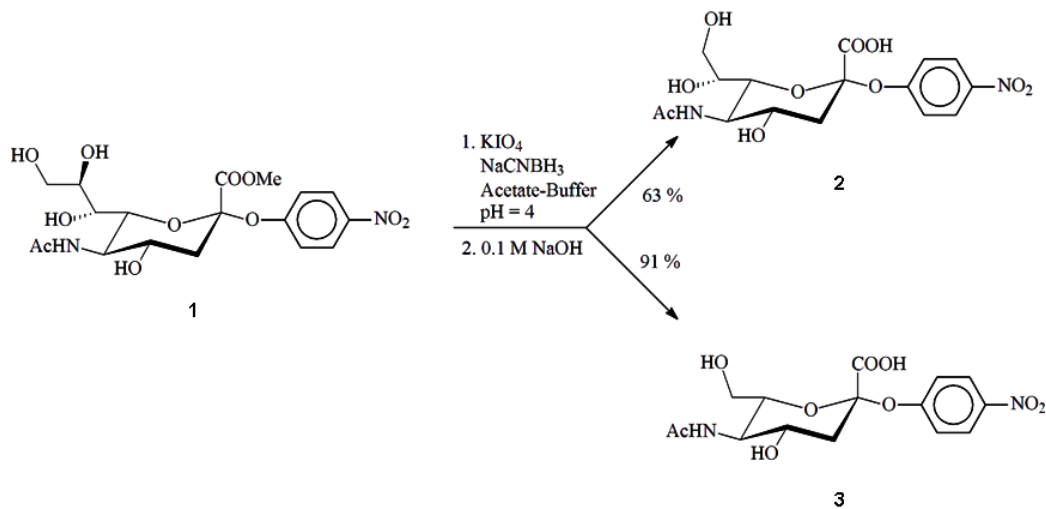
In diesem Vorhaben werden präparative chemoenzymatische Synthesen terminal sialylierter Heterooligosaccharide unter Nutzen von Transsialidase bearbeitet. Mit dem Klon der Transsialidase von *Trypanosoma cruzi*<sup>2-4</sup> (von Prof. Alberto C. Frasch, Buenos Aires) gelang die Expression des Enzyms in *E. coli* in hoher Konzentration und Reinheit. Bei den Aktivitätsmessungen konnten wir einem Vorschlag von Field et al. zur Abschätzung nicht-radioaktiv markierten Materials folgen.<sup>5</sup>

Die Arbeiten des ersten Abschnitts befassten sich mit den Donorsubstraten. Als bestes Donorsubstrat für Transsialidase am *T. cruzi* hat sich das Trisaccharid Sialyllactose (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc) erwiesen. Dieses komplexe Derivat ist allerdings wegen der schwierigen Isolierung u.a. aus Milch sehr teuer. Dann erscheint es nicht sinnvoll, von einem höheren zu einem anderen höheren Oligosaccharid überzugehen. Als effiziente Donorstrukturen haben sich ebenfalls die Sialoside von p-Nitrophenol (**1**, pNP- $\alpha$ Neu5Ac) und Methylumbelliferol (MU- $\alpha$ Neu5Ac) erwiesen. Zwar weisen die Arylsialoside eine deutlich verminderte Transferaktivität auf als Sialyllactose, aber weil die austretenden Phenole nicht als Akzeptorsubstrate infrage kommen, sind sie für Synthesen recht gut einsetzbar.<sup>6</sup> Als vornehmlicher Nachteil sind ihre schlechten Löslichkeiten in wässrigen Systemen zu nennen,

die die Enzymreaktionen behindern. Wünschenswert wären daher Arylsialoside mit ähnlichen Transferqualitäten, dagegen aber deutlich verbesserten Lösungseigenschaften.

Im Zwischenbericht von April 2006 konnten wir über die Synthese solcher neuartigen Donorsubstrate berichten, die allerdings keine überzeugenden Eigenschaften aufwiesen. Daher haben wir für die Synthese im Wesentlichen auf die benannten Phenolglycoside der N-Acetylneuraminsäure mit Methylumbelliferol und p-Nitrophenol zurückgegriffen. Mit diesen gelangen Darstellungen vieler neuer Trisaccharid-Strukturen mit terminaler  $\alpha$ -verknüpfter N-Acetylneuraminsäure.<sup>7</sup>

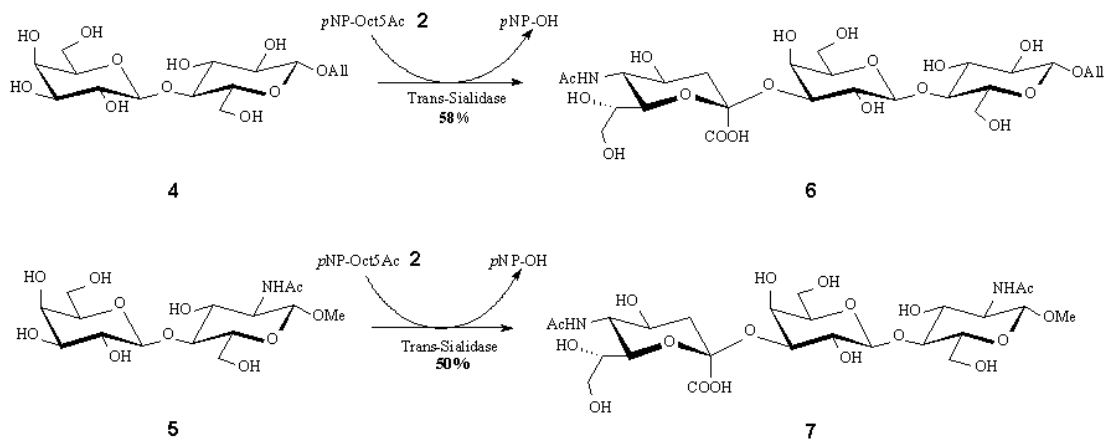
Es war außerdem von Interesse, ob die Glycerinseitenkette der Erkennung des Donorsubstrats dient. Um diese Frage zu beantworten, wurde durch teilweise bzw. vollständige Periodatspaltung des Donorsubstrats **1** die Octose- (**2**) bzw. Heptose-Donoren **3** gewonnen.



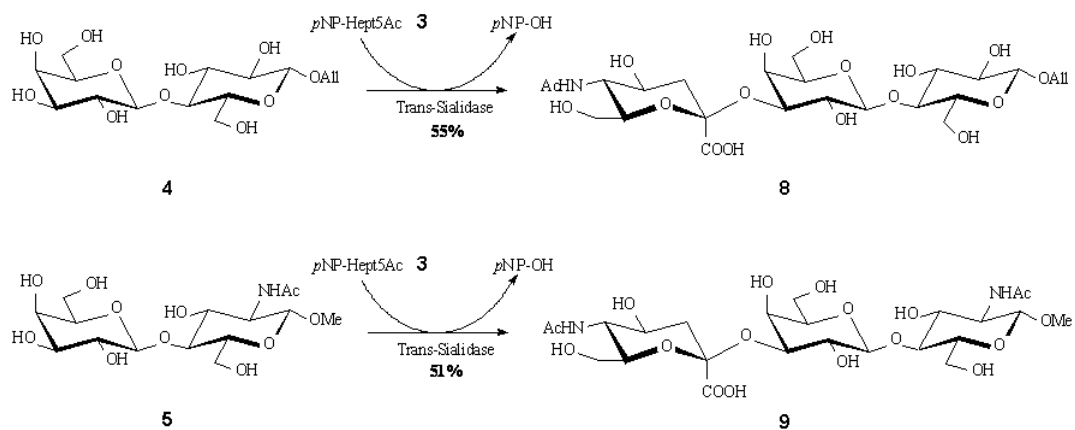
Schema 1

Wie sich überraschend zeigt, ließen sich beide Donorsubstrate problemlos auf die verschiedenen Disaccharid-Akzeptorsubstrate Allyl- $\beta$ -lactosid (**4**) bzw. Methyl- $\beta$ -lactosaminid (**5**) regio- und stereospezifisch zu den neuartigen Trisaccharid-Derivaten Oct5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-OAll (**6**) und Oct5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-OMe (**7**), sowie Hept5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-OAll (**8**) und Hept 5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ -1-4GlcNAc $\beta$ 1-OMe (**9**) umsetzen.<sup>8</sup>

Damit besteht ein effizienter Syntheseweg zu neuartigen Thomsen-Friedenreich Antigen-Komponenten,<sup>9</sup> deren Untersuchungen im Bezug auf ihre Bindung an das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) mit dem AK Kelm, Universität Bremen, vorgesehen sind.

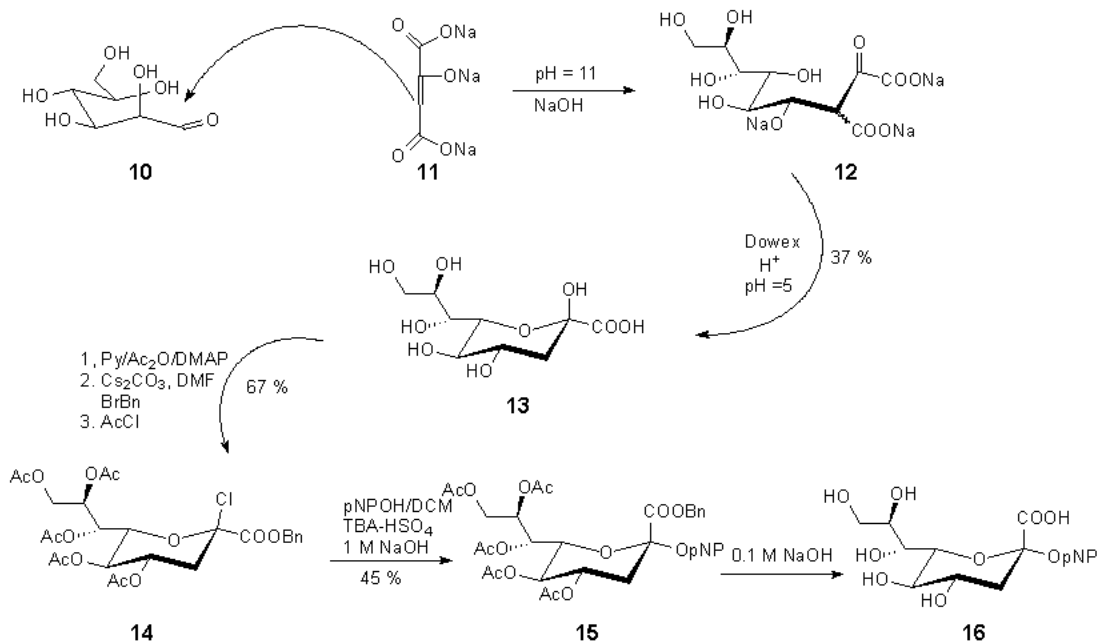


Schema 2



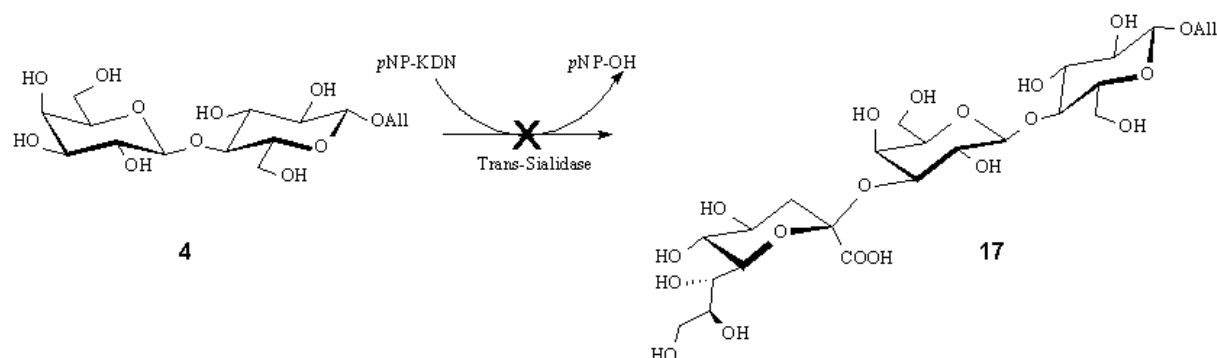
Schema 3

In Anlehnung an die erste chemische Synthese von Neu5Ac nach Cornforth et al.<sup>10</sup> durch Aldoreaktion von ManNAc mit Oxalacetat konnten wir nach Ogura et al. aus Mannose (**10**) und Oxalacetat **11** über das Intermediat (**12**) die Ketodesoxynonulonsäure (KDN) **13**, das 5-Hydroxy-Analogon der Neu5Ac herstellen.<sup>11</sup> Daraus ließ sich in drei Stufen das Glycosylchlorid des Benzylesters **14** gewinnen und über **15** in das KDN-Donorsubstrat **16** umsetzen.<sup>12</sup>



Schema 4

Erneut wurde mit dem Allyllactosid **4** als Akzeptor die Transsialidase-katalysierte Umsetzung mit **16** geprüft, jedoch konnte die Bildung des modifizierten Trisaccharids **17** nicht beobachtet werden.<sup>12</sup> Offenbar ist also das Erkennungsmerkmal der 5-N-Ac-Gruppe für das TSia-Enzym von essentieller Bedeutung.

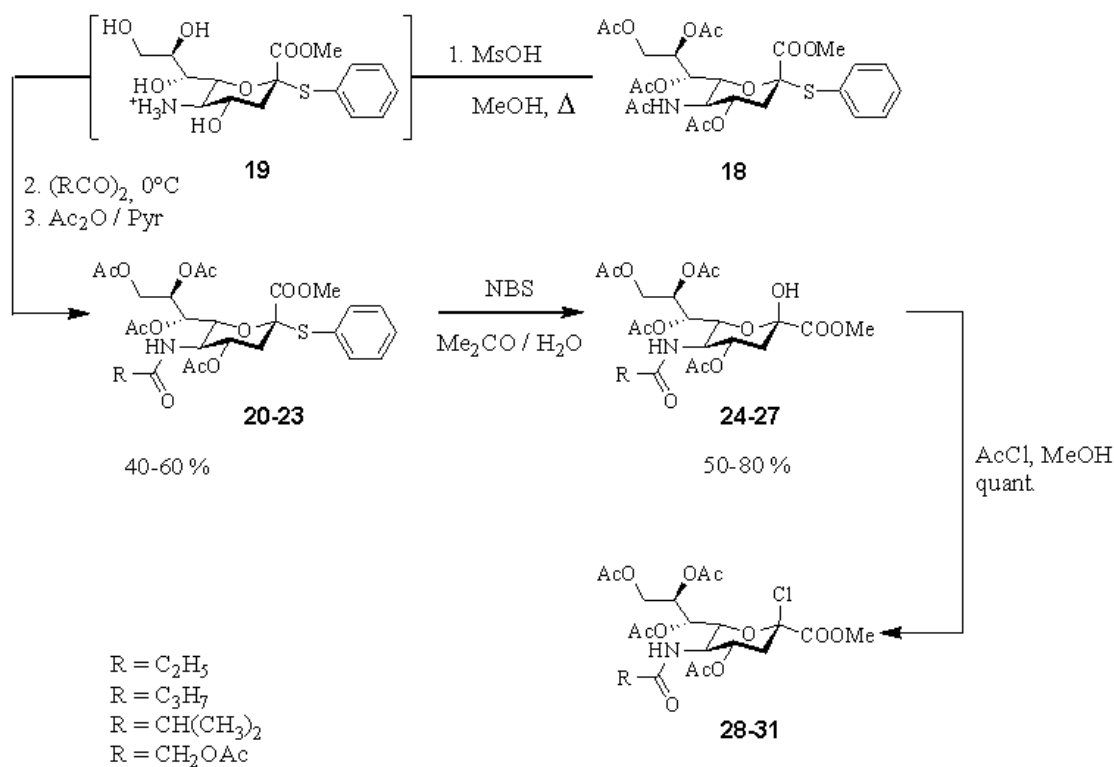


Schema 5

Inzwischen wurden Kristallstrukturdaten der TSia aus *T. cruzi* veröffentlicht.<sup>13</sup> Durch Einmodellierung von Sialyllactose als Donorsubstrat in das aktive Zentrum ließen sich Rückschlüsse auf die an der Substraterkennung wesentlich beteiligten Aminosäuren ziehen. Demgemäß war es im Rahmen dieser Untersuchungen ebenfalls von Interesse, Veränderungen an der Struktur der 5-N-Acetylgruppe vorzunehmen und so die Breite der Donorsubstratmodifikation zu prüfen.

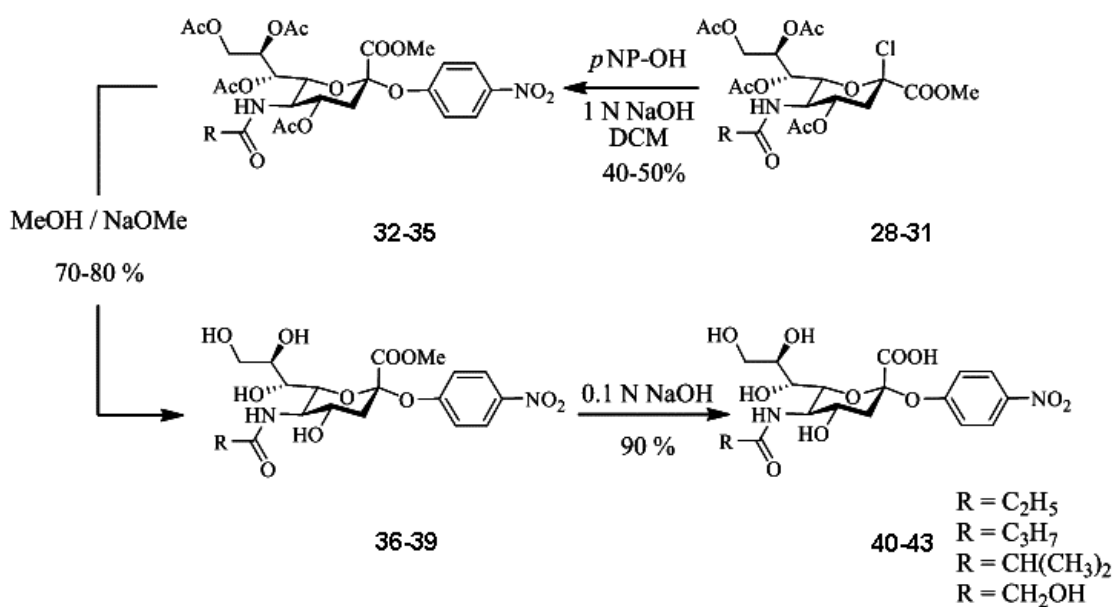
Aus dem Phenylthioglycosid des Neu5Ac-Derivats **18**<sup>14</sup> wurde nach N-Acetyl-Spaltung mit Methansulfonsäure in Methanol (vgl.<sup>15</sup>) über das Intermediat **19** durch unterschiedliche N-

Acylierungen die Derivate **20-23** erhalten. Spaltung der Thioacetale zu **24-27** und Umsetzung mit Acetylchlorid gab die modifizierten Neu5NAcyl-Glycosylchloride **28-31**.



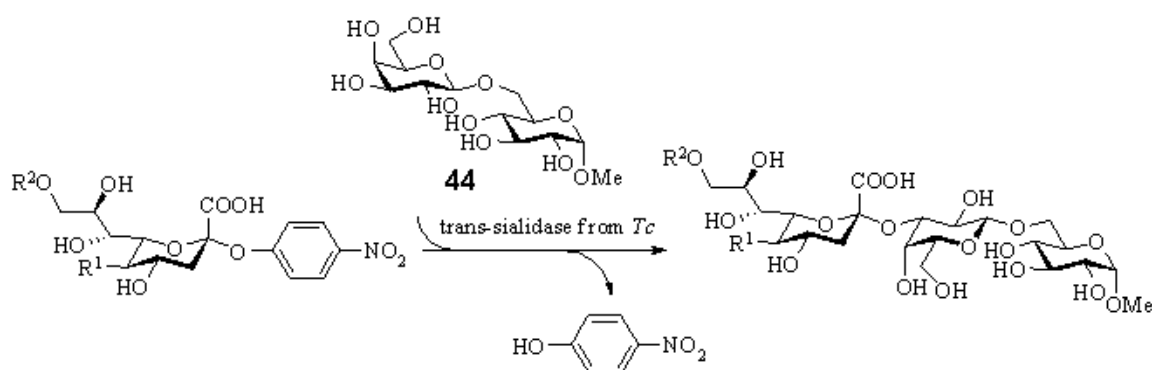
Schema 6

Weiterhin wurde mit *p*-Nitrophenol zu **32-35** glycosyliert, die O-Acetylgruppen nach Zemplén zu **36-39** abgespalten und die Ester wässrig-alkalisch zu den Zielprodukten **40-43** verseift.



Schema 7

Als Akzeptorsubstrat wurde Methyl- $\alpha$ -allolactosid **44** gewählt und mit allen aufgeführten Donorsubstraten (**1**, **40-43** und **46-47**) unter Bildung der Trisaccharide zur Reaktion gebracht. Während das bekannte N-Acetylderivat **1** sowie das an O-9 ebenfalls O-acetylierte Derivat **45** hervorragend und in hohen Ausbeuten reagierten, trat beim N-Propionylderivat **39** schon ein Einbruch mit immerhin noch 32 % an **50** auf. Die N-Butyryl-**(1)** sowie die N-Isobutyryl-Derivate **42** reagierten nicht. Überraschend gut dagegen ließ sich der N-Glycolyl-Donor **45** zum Trisaccharid **51** umsetzen. Dies ist insofern bemerkenswert als N-Glycolylderivate nicht im Metabolismus beim Menschen, wohl aber bis zu den höchst entwickelten Affen auftreten. Versuche zur Umsetzung der 5-Amino-**(46)** bzw. 5-Azido-Donoren **47** gaben keine Umsetzung.<sup>16</sup>



			Ausbeute	
<b>1</b>	$R^1 = \text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}$	$R^2 = \text{H}$	80 %	<b>48</b>
<b>45</b>	$R^1 = \text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}$	$R^2 = \text{C}_4\text{H}_7\text{O}$	78 %	<b>49</b>
<b>40</b>	$R^1 = \text{C}_2\text{H}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}$	$R^2 = \text{H}$	32 %	<b>50</b>
<b>41</b>	$R^1 = \text{C}_3\text{H}_7-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}$	$R^2 = \text{H}$	0 %	
<b>42</b>	$R^1 = (\text{H}_3\text{C})_2\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}$	$R^2 = \text{H}$	0 %	
<b>43</b>	$R^1 = \text{HOH}_2\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}$	$R^2 = \text{H}$	60 %	<b>51</b>
<b>46</b>	$R^1 = \text{NH}_2$	$R^2 = \text{H}$	0 %	
<b>47</b>	$R^1 = \text{N}_3$	$R^2 = \text{H}$	0 %	

Schema 8

Die Transferraten konnten NMR-spektroskopisch durch Integration der aromatischen Protonen in dem Donorsubstraten bzw. p-Nitrophenol ermittelt werden. Die ermittelten  $V_{\text{max}}$ -Werte und Michaelis-Konstanten ( $K_M$ ) wurden ermittelt und in der Lineweaver-Burk-Darstellung aufgetragen. Sie zeigen die bereits aus der Ausbeutenermittlung erwarteten Verlauf der Effizienz dieser Donorsubstrate.<sup>16</sup>

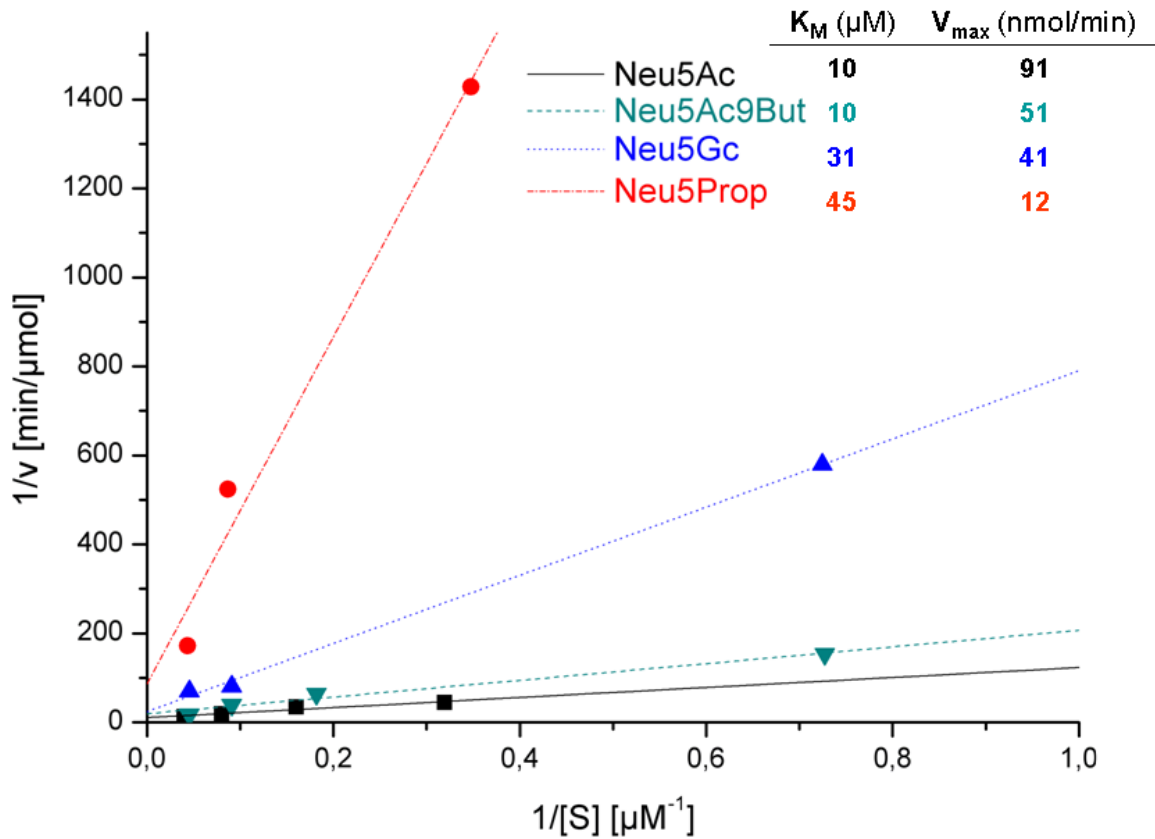


Figure 1

### Zusammenfassung

Im Rahmen der Untersuchungen konnte durch Expression eines TSia (*T. cruzi*) Klons in *E. coli* die Transsialidase in präparativ handhabbaren Mengen erzeugt werden. Synthesen von Neu5Ac-Glycosiden als modifizierte Donorsubstrate ergaben, dass die Phenolglycoside am besten für Umsetzungen mit TSia geeignet waren. Eine Reihe von Akzeptor-veränderten Substraten ließen sich mit diesen Donoren zu Trisacchariden umsetzen. Diese Versuche zeigen eine hohe Toleranz des Enzyms bei präparativen Synthesen. Im Weiteren ging es an die Veränderung an den Neu5Ac-Phenolglycosiden, indem die C7-C-9 Glycerinseitenkette durch Periodatspaltung zum Octose- bzw. Heptosederivat verkürzt wurde. Überraschend ließen sich diese Donoren problemlos zur TSia-katalysierten Synthese von im terminalen Zucker modifizierten Trisacchariden verwenden. Dagegen konnte TSia das dem Neu5Ac-pNP-analoge KDN-pNP-Glycosid nicht erkennen. Schließlich wurden in Mehrstufensynthesen eine Reihe von N-acylierten Neuraminsäure-pNP-Glycosiden dargestellt und ihre TSia-katalysierte Reaktion mit einem Allolactosid überprüft. Dabei zeigt sich im Wesentlichen, dass die TSia auf Veränderungen an der N-Acylfunktion recht empfindlich reagiert. So wird das N- Propionyl- und das N-Glycolyl-Derivat erkannt, während höhere N-Acyl-Verbindungen nicht mehr reagieren.

Diese Untersuchungen haben das Verständnis zur chemoenzymatischen Nutzung der Transsialidas (*Trypanosoma cruzi*) nachhaltig vorangebracht, wonach nun umfangreiche Befunde über die Donor- sowie Akzeptorsubstratspezifität und –Toleranz vorliegen.

## Literatur

1. R. Schauer, J. P. Kamerling, *New Compr. Biochem.*, **1997**, 29b, 243-402.
2. A. Buschiazzo, G. A. Tavares, O. Campetella, S. Spinelli, M. L. Cremona, G. Paris, M. F. Amaya, A. C. Frasch, P. M. Alzari, *Embo J.*, **2000**, 19, 16-24.
3. A. Buschiazzo, M. L. Cremona, G. Paris, M. F. Amaya, A. C. Frasch, P. M. Alzari, *Mol. Cell*, **2002**, 10, 757-768.
4. A. G. Watts, I. Damager, M. F. Amaya, A. Buschiazzo, P. M. Alzari, A. C. Frasch, S. G. Withers, *J. Am Chem. Soc.*, **2003**, 125, 7532-3.
5. W. B. Turnbull, J. A. Harrison, A. K. R. Kartha, S. Schenkman, R. A. Field, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 3207-12.
6. P. Scudder, J. P. Doom, M. Chuenkova, I. D. Manger, M. E. A. Pereira, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 9886-9891.
7. B. Neubacher, D. Schmidt, P. Ziegelmeüller, J. Thiem, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 1551-1556.
8. B. Neubacher, S. Scheid, S. Kelm, A. C. Frasch, B. Meyer, J. Thiem, *ChemBioChem.*, **2006**, 7, 896-899.
9. L. Kröger, A. Scudlo, J. Thiem, *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, 348, 1217-1227.
10. J. W. Conforth, M. E. Firth, A. Gottschalk, *Biochem. J.*, **1958**, 68, 57-64.
11. M. Nakamura, K. Furuhata, H. Ogura, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 4807-4813.
12. B. Neubacher, Dissertation, Univ. Hamburg 2005.
13. M. F. Amaya, A. G. Watts, I. Damager, A. Wehenkel, T. Nguyen, A. Buschiazzo, G. Paris, A. C. Frasch, S. G. Withers, P. M. Alzari, *Structure (Cambridge, MA, U. S.)*, **2004**, 10, 757-768.
14. J. Rothermel, H. Faillard, *Carbohydr. Res.*, **1990**, 196, 29-40.
15. T. Sugata, R. Higuchi, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2613-2614.
16. A. Schroven, S. Meinke, P. Ziegelmeüller, J. Thiem, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 9012-9021.

## Danksagung

Wir danken der Max-Buchner-Forschungstiftung für die Förderung unserer Untersuchungen.